

AB



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: 2 130 073
 (21) Número de solicitud: 9701156
 (61) Int. Cl.⁶: C12Q 1/34
 C12P 19/12
 C07H 3/04

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: 28.05.97

(71) Solicitante/s:
Consejo Superior Investigaciones Científicas
C/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(43) Fecha de publicación de la solicitud: 16.06.99

(72) Inventor/es: **Cañada Vicinay, Francisco J.;**
Fernández-Mayoralas Alvarez, Alfonso;
Martín Lomas, Manuel y
Montero Prieto, Esther(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.99(74) Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**(54) Título: Mejoras en el procedimiento de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

(57) Resumen:

Mejoras en el procedimiento de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, caracterizado porque dicho procedimiento comprende: a) reacción de xirosa y un sustrato β -D-galactopiranósido en presencia de una enzima β -glicosidasa, siendo la concentración de xirosa de 2 a 20 veces superior a la del β -D-galactopiranósido, en un medio acuoso tamponado a pH comprendido entre 5,0 y 9,0 y a una temperatura comprendida entre 4 y 37°C. b) desactivación de la enzima β -glicosidasa cuando se alcanza el máximo rendimiento de formación de disacáridos detectado mediante cromatografía en capa fina. c) aislamiento de los disacáridos formados mediante filtración en columnas de relleno, utilizando como eluyente agua o mezclas agua/alcohol.

ES 2 130 073 A1

DESCRIPCION

Mejoras en el procedimiento de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

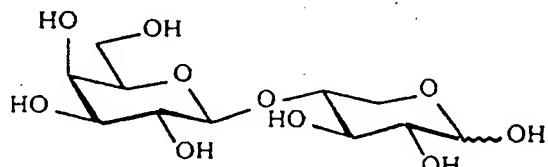
5 Sector de la técnica

Sector ciencias de la salud, técnicas de diagnóstico de lactasa intestinal.

10 Estado de la técnica

La lactasa intestinal es la enzima responsable de hidrolizar la lactosa ingerida en la dieta en sus componentes monosacáridos, glucosa y galactosa, para que sean absorbidos desde el intestino y metabolizados. La deficiencia o baja actividad en lactasa intestinal es rara como error metabólico congénito, 15 pero es un síndrome muy frecuente en humanos adultos. En individuos que presentan baja actividad en lactasa intestinal, la consumición de leche les provoca la aparición de trastornos gástricos tales como flatos y diarreas. Por tanto, la determinación de la actividad lactasa intestinal es de importancia tanto en pediatría como en gastroenterología.

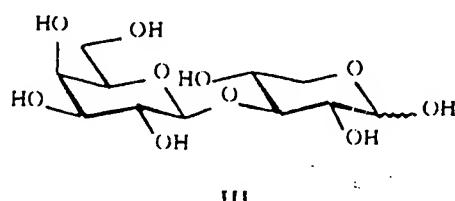
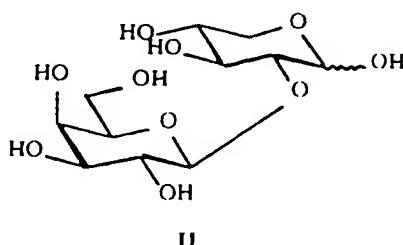
20 En la patente española ES-P-9001680 se describe un método no cruento, de fácil manejo y directo, para la evaluación de la actividad lactasa intestinal basado en la administración oral de un disacárido de estructura similar a la lactosa, la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa de fórmula I, y análisis de la D-xilosa excretada en orina mediante colorimetría. Este método mejora a los descritos previamente en las 25 patentes españolas ES-P-478590 y ES-P-482073, que hacen uso también de un disacárido derivado de la lactosa, la 3-O-metil-lactosa, pero que necesitan de un cromatógrafo de gases para la detección de la 3-O-metil-D-glucosa en la orina.



30...

35

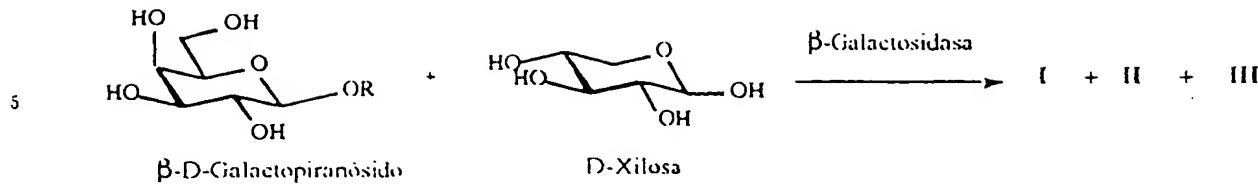
40 La patente española ES-P-9502185 describe un procedimiento simplificado de obtención del compuesto I junto con los regiosímeros 2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa de fórmula II y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa de fórmula III. En esta patente se reivindica el uso de las β -D-galactopiranosil-D-xilosas I, II, y III, para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, y se observa que los disacáridos de las 45 fórmulas II y III son mejores sustratos de la lactasa intestinal que el compuesto de fórmula I y que la 3-O-metil-lactosa, a pesar de que estas últimas son estructuralmente más parecidas a la lactosa.



50

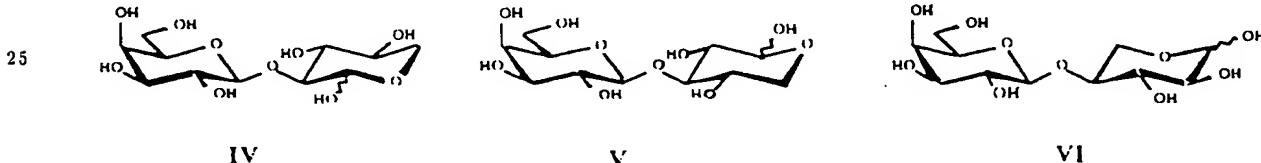
55

60 El procedimiento de obtención de los compuestos I, II y III según la patente ES-P-9502185, se realiza mediante la reacción de una D-xilosa y un sustrato β -D-galactopiranósido en presencia de una enzima β -galactosidasa, preferentemente la β -galactosidasa de *E. coli*, según el esquema de reacción



10 **Descripción de la invención**

La presente invención tiene como objeto mejorar el procedimiento descrito en la patente española ES-P-9502185, mediante la obtención de reacciones con altas proporciones de los disacáridos II y III, mejores sustratos de la lactasa intestinal que I, empleando enzimas de diferentes fuentes. También se 15 describe y reivindica la preparación, empleando el mismo procedimiento, de los disacáridos análogos que contienen un residuo de xilosa de la serie L: los compuestos 2-O- β -D-galactopyranosil-L-xilosa (fórmula IV), 3-O- β -D-galactopyranosil-L-xilosa (fórmula V) y 4-O- β -D-galactopyranosil-L-xilosa (fórmula VI). Se ha observado que IV, V, y VI son sustratos de la enzima lactasa intestinal, conduciendo tras hidrólisis a 20 D-galactosa y L-xilosa, ésta última detectable mediante colorimetría. Por tanto, los compuestos IV, V, VI son potencialmente utilizables en la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.



30 El procedimiento de obtención de los disacáridos β -D-galactopyranosil-D- y L-xilosas (compuestos I-VI) se lleva a cabo a partir de D-xilosa o L-xilosa y un sustrato β -D-galactopyranósido, preferentemente *o*-nitrofenil β -D-galactopyranósido o lactosa, en presencia de una enzima β -glicosidasa. La concentración de xilosa está comprendida entre 2 y 20 veces la concentración del sustrato β -D-galactopyranosilo dador. 35 El medio de reacción es agua tamponada a pH de 5.0 a 9.0, en presencia o ausencia de codisolventes miscibles con agua tales como acetonitrilo, dimetilformamida o dimetilsulfóxido. La temperatura de la reacción puede ser cualquiera dentro del rango 4 a 37°C controlándose el progreso mediante cromatografía en capa fina o cromatografía de gases. Cuando se alcanza el máximo rendimiento de formación de disacáridos, la reacción se puede parar por congelación a -70°C y posterior lyophilización, o por desnaturización de la 40 enzima por calentamiento de la mezcla de reacción a 100°C o por separación y recuperación de la enzima del medio de reacción mediante técnicas de ultrafiltración. El aislamiento de los disacáridos formados puede realizarse bien por columna de filtración con Sephadex G-10 o Biogel P2, o bien, de forma más económica, con una columna de carbón activo. El eluyente puede ser agua o mezclas agua-alcohol.

45 Los resultados obtenidos con diversas enzimas comerciales: β -galactosidasa de testículo bovino, β -galactosidasa de hígado bovino, β -galactosidasa de *Escherichia coli*, β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y β -galactosidasa de *Saccharomyces fragilis* (todas ellas comercializadas por Sigma Aldrich España) y la propia enzima lactasa intestinal aislada de intestino de cordero, se resumen en las tablas I y II. Los resultados se presentan en términos de rendimientos de los compuestos I-III y IV-VI, empleando D- y L-xilosa respectivamente, referidos a la cantidad inicial de *o*-nitrofenil galactósido usado en la reacción. De los resultados recogidos en la columna "Relación de II + III/I" de la tabla I puede observarse que las 50 enzimas de testículo bovino, de *Aspergillus oryzae*, de *Saccharomyces fragilis*, y lactasa intestinal dieron valores más altos que la enzima de *Escherichia coli*, utilizada en la patente ES-P-9502185. Por tanto, estas enzimas mejoran el procedimiento descrito en la patente ES-P-9502185 con vistas a obtener mezclas 55 más enriquecidas en los disacáridos II y III.

La relación de disacáridos I-III y IV-VI obtenidos de la columna chromatográfica se determinó por chromatografía de gases con un cromatógrafo equipado con detector de ionización de llama y columna capilar SE-54 (15 m de longitud, 0.15mm de diámetro interno y 0.3 mm de espesor). En los análisis se empleó un flujo de nitrógeno de 1 mL/min. El programa de temperaturas utilizado fue: temperatura inicial 160 °C; tiempo inicial 2 min; incremento de temperatura 5°C/min; temperatura final 250°C. Las muestras se analizaron tras trimetilsililación mediante el protocolo siguiente: una alícuota (10 ml) se

congeló y liofilizó, al residuo seco se adicionó piridina (25 mL) que contenía como referencia interna bencil xilopiranosido (1 mM) y *N*-trimetilsilimidazol (25 mL), y se continuó la calefacción a 60°C durante 30 min. Los tiempos de retención de los picos asignables a los distintos disacáridos fueron los siguientes:

- 5 bencil xilopiranosido (referencia interna): 13,39 min.
- 4-*O*- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, disacárido I: 22,10 y 22,23 min.
- 2-*O*- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, disacárido II: 19,83 y 20,96 min.
- 3-*O*- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, disacárido III: 19,67 min.
- 10 2-*O*- β -D-galactopiranosil-L-xilosa, disacárido IV: 19,67 y 21,04 min.
- 3-*O*- β -D-galactopiranosil-L-xilosa, disacárido V: 19,54 y 19,83 min.
- 4-*O*- β -D-galactopiranosil-L-xilosa, disacárido VI: 20,95 min.

Los siguientes ejemplos muestran el procedimiento de síntesis y las medidas de actividad de los compuestos IV-VI frente a la lactasa intestinal de cordero.

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1

*Preparación de una mezcla de 4-*O*- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (disacárido I), 2-*O*- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (disacárido II) y 3-*O*- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (disacárido III)*

A una solución de *o*-nitrofenil β -D-galactopiranósido (1g, 32mM) y D-xilosa (5g, 320mM) en agua tamponada (26mM ácido acético, 100mM piridina, pH 5.8), se adicionó β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* de Sigma (8,3 mg, 5,3 u/mg) y la mezcla se incubó a 37°C durante 50 min. Pasado este tiempo, la mezcla se calentó a 100°C durante 10 min, se concentró y el residuo resultante se introdujo en una columna de carbón activado utilizando un gradiente de agua-etanol 1:0 -> 85:15. Se eluyeron primero los monosacáridos D-xilosa y galactosa, y seguidamente la mezcla de los disacáridos I, II y III. Se obtuvieron 370 mg de mezcla de disacáridos (36 % relativo a los equivalentes de *o*-nitrofenil β -D-galactopiranósido iniciales), en una relación I:II:III de 1.0:9.0:8.5 respectivamente.

Los disacáridos I, II y III se caracterizaron como se ha descrito anteriormente en la patente original ES-P-9502185.

Ejemplo 2

*Preparación de una mezcla de 2-*O*- β -D-galactopiranosil-L-xilosa (disacárido IV), 3-*O*- β -D-galactopiranosil-L-xilosa (disacárido V) y 4-*O*- β -D-galactopiranosil-L-xilosa (disacárido VI)*

A una solución de *o*-nitrofenil β -D-galactopiranósido (1g, 32mM) y L-xilosa, (5g, 320mM) en agua tamponada (26mM ácido acético, 100mM piridina, pH 5.8), se adicionó β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* de Sigma (8,3 mg, 5,3 u/mg) y la mezcla se incubó a 37°C durante 50 min. Pasado este tiempo, la mezcla se calentó a 100°C durante 10 min, se concentró y el residuo resultante se introdujo en una columna de carbón activado utilizando un gradiente de agua-etanol 1:0 -> 85:15. Se eluyeron primero los monosacáridos L-xilosa y galactosa, y seguidamente la mezcla de los disacáridos IV, V y VI. Se obtuvieron 404 mg de mezcla de disacáridos (39 % relativo a los equivalentes de *o*-nitrofenil β -D-galactopiranósido iniciales), en una relación IV:V:VI de 1:4:10 respectivamente.

De las distintas fracciones que contenían los disacáridos IV, V y VI, pudieron separarse algunas con cada uno de ellos puro, que se utilizaron para caracterizarlos por RMN.

Con objeto de caracterizar y determinar de forma inequívoca la regioquímica del enlace formado, las fracciones enriquecidas en cada uno de los disacáridos IV, V y VI se acetilaron y los productos resultantes se aislaron por HPLC semipreparativo (columna fase normal SiO₂, hexano-acetato de etilo 1:1, detección por índice de refracción). Posteriormente, se registró el espectro de ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) de los derivados obtenidos.

Ensayo cinético de la hidrólisis in vitro de IV, V, y VI por la lactasa intestinal

Los disacáridos β -D-galactopiranosil-L-xilosas (compuestos IV, V y VI) y lactosa como referencia se incubaron en presencia de la lactasa intestinal de cordero a pH 6,0, según el método de A. Rivera-Sagredo, F.J. Cañada, O. Nieto, J. Jiménez-Barbero y M. Martín-Loinas, Eur. J. Biochem., 209 (1992) 415-422.

ES 2 130 073 A1

Todos los β -D-galactopiranosil-L-xilosas fueron sustratos de la enzima y dieron lugar a D-galactosa y L-xilosa tras hidrólisis, con los siguientes resultados, relativos a constantes de Michaelis (K_m) y velocidades máximas (V_{max}):

Disacárido	K_m (mM)	V_{max} (%)
lactosa	11	100
disacárido IV	36	17
disacárido V	4	53
disacárido VI	47	51

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, **caracterizado** porque dicho procedimiento comprende:
 - 5 a) reacción de xilosa y un sustrato β -D-galactopiranósido en presencia de una enzima β -glicosidasa, siendo la concentración de xilosa de 2 a 20 veces superior a la del β -D-galactopiranósido, en un medio acuoso tamponado, a pH comprendido entre 5,0 y 9,0 y a una temperatura comprendida entre 4 y 37°C.
 - 10 b) desactivación de la enzima β -glicosidasa cuando se alcanza el máximo rendimiento de formación de disacáridos detectado mediante cromatografía en capa fina.
 - 15 c) aislamiento de los disacáridos formados mediante filtración en columnas de relleno, utilizando como eluyente agua o mezclas agua/alcohol.
- 15 2. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la xilosa empleada pertenece a la serie D.
- 20 3. Procedimiento enzimático, de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la xilosa empleada pertenece a la serie L.
- 25 4. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el β -D-galactopiranósido utilizado es *o*-nitrofenil β -D-galactopiranósido.
- 30 5. Procedimiento enzimático, de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el β -D-galactopiranósido utilizado es lactosa.
- 35 6. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la enzima β -glicosidasa es una β -galactosidasa de testículo bovino.
- 40 7. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la enzima β -glicosidasa es una β -galactosidasa de hígado bovino.
- 45 8. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la enzima β -glicosidasa es una β -galactosidasa de *Escherichia coli*.
9. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la enzima β -glicosidasa es una β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.
- 50 10. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la enzima β -glicosidasa es una β -galactosidasa de *Saccharomyces fragilis*.
- 55 11. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la enzima β -glicosidasa es una lactasa intestinal.
- 60 12. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque la desactivación de la enzima β -glicosidasa se realiza mediante calefacción a 100 °C.
13. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque la desactivación de la enzima β -glicosidasa se realiza mediante congelación a -70 °C y posterior liofilización.

ES 2 130 073 A 1

14. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en presencia de codisolventes miscibles con agua tales como acetonitrilo, dimetilformiamida o dimetilsulfóxido.
- 5 15. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque las columnas de filtración para el aislamiento de los disacáridos están llenas con Sephadex G-10 ó Biogel P-2.
- 10 16. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque las columnas de filtración para el aislamiento de los disacáridos están llenas con carbón activo.
- 15
- ;
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 130 073

⑫ N.º solicitud: 9701156

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.97

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q 1/34, C12P 19/12, C07H 3/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9717464 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 15.05.1997, todo el documento.	1-16
A	ES 2023556 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.01.1992, todo el documento.	1-16
A	RIVERA-SAGREDO, A. et al., "4-O-beta-D-galactopyranosyl-D-xylose: a new synthesis and application to the evaluation of intestinal lactase", CARBOHYDRATE RESEARCH, Vol. 228, 10 abril 1992, Amsterdam, NL, páginas 129-135, todo el documento.	1-16
A	ARAGON, J.J. et al., "Evaluation of rat intestinal lactase in vivo with 4-galactosylxylose", CLINICA CHIMICA ACTA, Vol. 210, 30 septiembre 1992, Amsterdam, NL, páginas 221-226, todo el documento.	1-16
A	LOPEZ, R. et al., "Enzymic beta-galactosidation of beta-xylopyranosides", BIOTECHNOL. LETT., Vol. 13, nº 10, 1991, páginas 705-710, todo el documento.	1-16
A	GORIN, P.A.J. et al., "The synthesis of beta-galacto- and beta-glucopyranosyl disaccharides by Sporobolomyces singularis", CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, Vol. 42, nº 10, octubre 1964, Ottawa, CA, páginas 2307-2317, página 2309, párrafo 1 - página 2313, párrafo 6.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 05.05.99	Examinador A. Maquedaño Herrero	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------